

На правах рукописи



ФЕДОРОВА КСЕНИЯ ПАВЛОВНА

**МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ФАКТОРА
ТРАНСКРИПЦИИ TNRA – ОСНОВНОГО РЕГУЛЯТОРА
АЗОТНОГО МЕТАБОЛИЗМА *BACILLUS SUBTILIS***

03.02.03 – микробиология

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2013

Работа выполнена на кафедре микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научные руководители: кандидат биологических наук, доцент
Каюмов Айрат Рашитович

доктор биологических наук, профессор
академик АН РТ
Ильинская Ольга Николаевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Ермилова Елена Викторовна
(ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет» профессор кафедры микробиологии)

доктор биологических наук, старший научный сотрудник **Коксин Владимир Петрович** (ГАУЗ «Республиканский центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями МЗ РТ» заведующий лабораторией биохимии)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки **Институт цитологии РАН**, г. Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «26» сентября 2013 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при Казанском (Приволжском) федеральном университете по адресу: г. Казань, ул. Кремлевская, 18, главное здание, аудитория № 211.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при Казанском (Приволжском) федеральном университете.

Автореферат разослан «___» июля 2013 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета

доктор биологических наук, профессор



З. И. Абрамова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Бактерии в ходе эволюции выработали сложные механизмы адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды и способны использовать широкий спектр источников питания. Понимание молекулярно-генетических механизмов адаптации микроорганизмов к стрессовым условиям актуально как для разработки новых принципов подавления роста патогенных бактерий, так и для повышения продуктивности промышленно значимых бактерий.

Азот является одним из важнейших макроэлементов и составляет до 10% сухого вещества клетки. В природе азот встречается в окисленной, восстановленной и молекулярной формах, но в конструктивном клеточном метаболизме азот используется только в восстановленной форме. Соли аммония, мочевины, органические соединения являются наиболее предпочтительными и легко усваиваемыми источниками азота для бактерий. Многие микроорганизмы способны потреблять и окисленные формы азота в виде нитратов и нитритов. В анаэробных условиях некоторые бактерии способны использовать нитрат в качестве конечного акцептора электронов, восстанавливая его до нитрита и газообразных форм азота (N_2O , NO , N_2) в процессе диссимиляционной нитратредукции. В ходе ассимиляционной нитратредукции многие бактерии способны восстанавливать окисленный азот и использовать его для синтеза азотсодержащих клеточных компонентов. Этот процесс протекает с дополнительными затратами энергии, поэтому условия дефицита восстановленного азота являются неблагоприятными для роста микроорганизмов. При низком содержании восстановленного азота (ионы аммония или глутамин в концентрациях менее 2 мМ) или в присутствии только окисленных форм азота (нитраты и нитриты независимо от концентрации) в клетках бактерий запускается каскад регуляторных процессов, направленных на утилизацию азота из разнообразных азотсодержащих соединений.

В клетках *Bacillus subtilis* фактор транскрипции TnrA контролирует гены, продукты которых вовлечены в процессы ассимиляции азотсодержащих соединений в условиях недостатка азота в среде: транспорт ионов аммония, ассимиляция мочевины, нитрата и нитрита и других соединений азота (Wray et al., 1996). Взаимодействуя с промоторами генов-мишеней, он активирует, или, наоборот, подавляет их транскрипцию (Yoshida et al., 2003). В отличие от других регуляторов транскрипции, фактор TnrA не имеет сайтов для ковалентной модификации и взаимодействия с низкомолекулярными эффекторными молекулами (лигандами) (Fisher, 1999). Это свидетельствует об уникальных механизмах передачи сигнала на этот регуляторный белок, которые на сегодняшний день остаются мало изученными. Ряд работ демонстрирует, что активность фактора TnrA контролируется путем

взаимодействия с другими белками. Белками-партнерами фактора транскрипции TnrA являются глутаминсинтетаза (GS) и белок GlnK (Forchhammer, 2008). Гомологи белка GlnK в клетках бактерий регулируют активность белка AmtB, осуществляющего активный транспорт ионов аммония в клетки (Wray et al., 2001; Heinrich et al., 2006; Tremblay, Hallenbeck, 2009). Возможно, белки AmtB, GlnK и GS образуют систему трансдукции сигнала о доступности азота на фактор транскрипции TnrA (Wray et al., 2001; Detsch, Stulke, 2003; Heinrich et al., 2006; Tremblay, Hallenbeck, 2009; Gunka, Commichau, 2012).

Цель работы – выяснение молекулярного механизма регуляции активности фактора транскрипции TnrA у *Bacillus subtilis* в условиях дефицита и избытка источника восстановленного азота.

В работе решали следующие **задачи**:

1. Определить участие глутаминсинтетазы и белков AmtB и GlnK в регуляции активности фактора транскрипции TnrA у *Bacillus subtilis* в условиях дефицита и избытка восстановленного азота.
2. Выявить изменение локализации фактора транскрипции TnrA при смене условий культивирования *Bacillus subtilis* (от дефицита источника восстановленного азота к его избытку).
3. Исследовать влияние белка GlnK и глутаминсинтетазы на ДНК-связывающую активность фактора транскрипции TnrA в условиях *in vitro*.
4. Создать генетические конструкции на основе плазмиды pET15b для гиперпродукции в клетках *E.coli* рекомбинантных белков TnrA с укороченным С-концевым доменом и гексагистидиновой последовательностью на N-конце белка и получить эти белки в электрофоретически гомогенном состоянии.
5. Установить сайты взаимодействия белка GlnK и глутаминсинтетазы с С-концевым доменом фактора TnrA, выявить регуляторную роль С-концевого домена в димеризации фактора транскрипции TnrA и связывании N-концевого домена с ДНК.
6. Изучить влияние фактора транскрипции TnrA на биосинтетическую активность глутаминсинтетазы при взаимодействии этих белков *in vitro* и внутриклеточно в штаммах *Bacillus subtilis* дикого типа и мутантных по белкам AmtB и GlnK.

Научная новизна

Впервые показано, что смена аффинности глутаминсинтетазы и белка GlnK к TnrA определяет локализацию фактора TnrA и регулирует его активность в зависимости от условий дефицита или избытка восстановленного азота в среде. Белок AmtB, ответственный за транспорт ионов аммония в клетку и формирующий сигнал о доступности азота в клетках многих организмов, не

участвует в передаче сигнала на фактор TnrA у бацилл. Впервые установлено, что *in vivo* глутаминсинтетаза подавляет активность фактора транскрипции TnrA не только в условиях избытка восстановленного азота, как сообщалось ранее (Wray et al., 2001), но и в условиях его недостатка. Эксперименты *in vitro* показали, что белок GlnK не подавляет ДНК-связывающую активность TnrA, в то время как активная и ингибированная формы глутаминсинтетазы в разной степени снижают способность TnrA взаимодействовать с ДНК. Впервые продемонстрировано, что С-концевая область TnrA не участвует в димеризации белка, но контролирует ДНК-связывающую активность N-концевого домена. Установлено, что за взаимодействие с белком GlnK и глутаминсинтетазой отвечают разные участки С-концевого домена фактора транскрипции TnrA. Впервые охарактеризован ингибирующий эффект фактора транскрипции TnrA на ферментативную активность глутаминсинтетазы.

Практическая значимость

Полученные результаты представляют собой новый блок фундаментальных знаний о регуляции азотного метаболизма в клетках бактерий. Примеры регуляции активности факторов транскрипции путем взаимодействия с ферментом представлены на сегодняшний день единичными случаями, полученные результаты расширяют представления о способах контроля активности ДНК-связывающих белков в клетке. Учитывая значение азотного питания для жизнедеятельности микроорганизмов, полученные данные могут быть применены в биотехнологических процессах, требующих особого внимания к регуляторным механизмам микроорганизмов, связанных с культивированием генномодифицированных бактерий для продукции целевых белков и азотсодержащих метаболитов, а также в биомедицине для поиска ингибиторов азотного обмена клетки.

Связь работы с научными программами

Работа выполнена в соответствии с тематическим планом КФУ, регистрационный номер 01201259687 «Идентификация молекулярных детерминант терапевтического потенциала микробных нуклеаз». Исследования поддержаны грантами ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2008-2013 годы ГК №П1275, №16.740.11.0611, №14.740.11.1040, №14.А18.21.0185, №14.132.21.1322, грантом РФФИ 2012.12-04-31472 мол_а, грантами Минобрнауки России и DAAD по программе «Михаил Ломоносов» А/10/74537, А/12/75478.

Положения, выносимые на защиту:

1. В клетках бацилл активность фактора транскрипции TnrA зависит от количественного соотношения его комплекса с белком GlnK (активная форма белка TnrA) и глутаминсинтетазой (неактивная форма белка TnrA), и определяется изменением аффинности белка GlnK и глутаминсинтетазы к

фактору TnrA в зависимости от условий дефицита или избытка восстановленного азота.

2. С-концевой домен фактора транскрипции TnrA является регулятором активности ДНК-связывающего N-концевого домена и конкурентно взаимодействует с глутаминсинтетазой на участке Phe105 – Arg110 и белком GlnK на участке Leu75 – Pro90.
3. Биосинтетическая активность глутаминсинтетазы подавляется при ее связывании с фактором TnrA: этот уникальный механизм является одним из основных путей регуляции активности фермента в ответ на изменение доступности источников азота для клетки.

Апробация работы

Материалы диссертации доложены и обсуждены на IV Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Казань, 2009), Международной конференции «Развитие междисциплинарных исследований: перспективные направления и вклад DAAD» (Казань, 2009), XIII европейском симпозиуме студентов-биологов «SymBioSE 2009», Международных конференциях аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2009, 2011), Российской школе молодых ученых «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии» (Казань, 2010), Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 2010), Международных Пущинских школах-конференциях молодых ученых (Пущино, 2010, 2011, 2013), Всероссийской научно-практической (заочной) конференции «Естественные науки и современность: проблемы и перспективы исследований» (Москва, 2011), Международной конференции молодых ученых «Молодежь в науке – 2011» (Минск, 2011), III Международной научной конференции по биологии (Тбилиси, 2011), Ежегодной международной конференции «Ассоциация общей и прикладной микробиологии» (Тюбинген, 2012), III Международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2012).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 30 научных работ, в том числе 6 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для опубликования материалов диссертаций.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность научному руководителю к.б.н., доценту каф. генетики А.Р. Каюмову за постановку проблемы, помощь в обсуждении результатов и проведении экспериментов; научному руководителю д.б.н., профессору, академику АН РТ О.Н. Ильинской за внимательное отношение к работе и неоценимую помощь на всех этапах работы; профессору Карлу Форшхаммеру за научную консультацию в области регуляции азотного обмена бактерий, предоставленные штаммы и плазмиды, а

также за возможность проведения ППР анализа на базе университета им. Карла-Эберхарда г. Тюбингена, Германия; профессору Йоргу Штульке (университет г. Геттингена, Германия) за предоставленные штаммы *B.subtilis*.

Структура и объем диссертации. Диссертация включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований, обсуждение результатов, выводы и список литературы. Работа изложена на 123 страницах машинописного текста, содержит 14 таблиц и 32 рисунка. Цитируемая литература включает 103 источника, из них 100 иностранных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы и плазмиды. Штаммы *Bacillus subtilis* были предоставлены профессором Йоргом Штульке: *B.subtilis* GP250 *trpC2 amyE::(nrgA-lacZ aphA3) Km^r*, *B.subtilis* GP251 *trpC2 amyE::(nrgA-lacZ aphA3) Km^r ΔglnA::cat Cm^r*, *B.subtilis* GP253 *trpC2 amyE::(nrgA-lacZ aphA3) Km^r ΔnrgB::cat Cm^r*, *B.subtilis* GP254 *trpC2 amyE::(nrgA-lacZ aphA3) Km^r ΔnrgA::cat Cm^r*, (Detsch, Stulke, 2003). Штаммы *E.coli* и плазмиды были предоставлены профессором Карлом Форшхаммером: *E.coli* XLI-Blue (*recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac*), *E.coli* BL21 (*dcm ompT hsdS (r_B⁻ m_B⁻) gal λ(DE3)*), плазмиды - pET15b-TnrA, pDJ148-GlnK, pGP174 (Heinrich et al., 2006).

Культивирование бактерий проводили на средах LB (Sambrook et al., 1989) и синтетической минимальной среде SMM (Anagnostopoulous et al., 1961), содержащей 0.05 мг/мл L-триптофана, в качестве источника углерода - 0.5% глюкозу, в качестве источника азота - 20 мМ NaNO₃ или 2 мМ глутамина (недостаток источника восстановленного азота). Для создания условий избытка восстановленного азота вносили 20 мМ NH₄Cl или 20 мМ глутамина. В среду вносили антибиотики: 100 мкг/мл ампициллина для штаммов *E.coli*, 10 мкг/мл хлорамфеникола или канамицина для штаммов *B.subtilis*.

Конструирование плазмид. Клонирование проводили с использованием ферментов фирмы «Сибэнзим» (Москва) в условиях, рекомендованных производителем. Мутантные гены *tnrA6*, *tnrA20*, *tnrA30* и *tnrA43* амплифицировали с хромосомной ДНК *B.subtilis* 168 с использованием синтетических олигонуклеотидов TnrAN (5' GCT CGA GGA TCC GAT GAC CAC AGA AGA TCA TTC TT 3') и TnrA6 (5' TTA ACG GGA TCC GTA CCG TTA GTG AGC ATT AAG 3'), TnrA20 (5' TCC AGC GGA TCC TTC CGC ACT TAC GGA TC 3'), TnrA35 (5' TTC TTT GGA TCC CAT ATC CTT TAA AAT CTC TGC 3') или TnrA43 (5' TGC CGT GGA TCC GCC TTA TTC ACG CTT ATT G 3'). Сайт рестрикции *Bam*HI подчеркнут. Продукт амплификации и вектор pET15b рестрицировали по сайтам *Bam*HI и лигировали. Лигазной смесью трансформировали штамм *E.coli* XL1 Blue, как описано в (Merrick et al., 1987). Отсутствие ошибок в клонированной последовательности проверяли секвенированием в фирме «Синтол».

Гиперпродукция и очистка белков. Очистку нативного и рекомбинантных белков TnrA с гексагистидиновой последовательностью проводили на Ni-NTA сефарозе, белков GlnK и GS со стрептавидиновой последовательностью - на стреп-тактин сефарозе (Heinrich et al., 2006).

ППР анализ ДНК-связывающей активности фактора TnrA проводили методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) на приборе BIAcore X (Biacore AB, Швеция) с использованием сенсорного чипа SA как описано в (Федорова с соавт. 2013). ППР анализ взаимодействия TnrA с GlnK и GS проводили с использованием чипа Ni²⁺-NTA как описано в (Fokina et al., 2011; Kaumov et al., 2011; Fedorova et al., 2013).

Иммуноблоттинг для идентификации белков TnrA, GlnK и GS проводили как описано в (Heinrich et al., 2006).

Иммунопреципитацию белков-партнеров TnrA в различных условиях роста проводили как в (Bonifacino et al., 2001).

Анализ олигомеризации белков TnrA методом поперечных сшивок проводили в присутствии глутарового альдегида (Fokina et al., 2011).

Pull Down анализ. Для изучения белковых взаимодействий по 10 нМ каждого белка растворяли в 300 мкл буфера В (100 мМ трис-HCl pH 8.0, 200 мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂, 1 мМ ЭДТА) и инкубировали при 20°C в течение 30 мин. Далее белковую смесь наносили на колонки с Ni-NTA сефарозой (Qiagen) или со стреп-тактин сефарозой (IBA), уравновешенные 10 объемами колонки буфера В, с последующей 4-кратной промывкой 5 объемами того же буфера. Элюировали белки буфером Е (буфер В с 250 мМ имидазолом для Ni-NTA сефарозы или с 2.5 мМ дестиобиотином для стреп-тактин сефарозы) и анализировали методом иммуноблоттинга.

Определение ферментативной активности. Определение активности β-галактозидазы проводили по расщеплению орто-нитрофенил-β-D-галактопиранозида (Miller, 1972). Биосинтетическую активность GS определяли по скорости образования γ-глутамилгидроксомата (Gawronski, Benson, 2004).

Определение концентрации ионов аммония в культуральной жидкости с помощью реактива Несслера проводили как описано в (Hart et al., 1994).

Биоинформатика. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности анализировали с помощью сервера Bioinformatics.Org (Stothard, 2000), алгоритма BLAST (Altschul et al., 1997) и ClustalW (Thompson et al., 1994). Модель вторичной структуры белка TnrA получена с использованием сервера Phyre (Kelley, Sternberg, 2009). Третичную структуру TnrA моделировали в программе PyMOL Molecular Graphics System. Кинетические параметры взаимодействия TnrA с ДНК и белками GS и GlnK вычисляли в программе BIAevaluation 3.0 Software 1997 и GraphPad Prism 5. Дизайн праймеров и анализ сайтов рестрикции проводили в программе Clone Manager 6.

Математическую обработку данных проводили в программе Statgraphics Plus. Нормальность распределения оценивали по критерию Колмогорова-Смирнова. Для оценки разности средних использовали критерий Стьюдента для выборок с нормальным распределением ($\alpha=0.05$) и непараметрический критерий Манна-Уитни в случае, когда выборка не описывалась законом нормального распределения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Активность и локализация фактора транскрипции TnrA в условиях избытка или недостатка восстановленного азота

Фактор транскрипции TnrA в клетках бацилл активен при дефиците восстановленного азота или при наличии трудно усваиваемых альтернативных источников азота независимо от их концентрации в среде (Wray et al., 1996; Gunka, Commichau, 2012). При избытке восстановленного азота в клетке повышается уровень глутамина, который приводит к ингибированию глутаминсинтетазы (GS) по типу обратной связи. Ингибированная GS образует комплекс с фактором TnrA и инактивирует его (Wray et al., 2001). В активном состоянии фактор TnrA локализован на клеточной мембране в комплексе с белками транспорта аммония GlnK-AmtB (Heinrich et al., 2006). Возможно, белки AmtB, GlnK и GS с фактором TnrA образуют систему сигнальной трансдукции, однако их роль в формировании и передачи сигнала доступности азота до конца не изучена. (Heinrich et al., 2006; Gunka, Commichau, 2012).

Изучали активность фактора TnrA по активности β -галактозидазы, экспрессируемой с TnrA-зависимого промотора *nrgA*, в штаммах бацилл, дефектных по белкам GlnK, AmtB и GS. Белки AmtB в клетках различных организмов могут участвовать в формировании сигнала о доступности азота (Tremblay, Hallenbeck, 2009). В условиях азотного голодания в клетках, мутантных по белку AmtB, активность TnrA была в 9 раз выше по сравнению с исходным штаммом (рис. 1 А). В этих клетках фактор TnrA конститутивно связан с белком GlnK (Kayumov et al., 2011), и взаимодействие с GlnK не подавляет активность фактора транскрипции TnrA. Однако внесение избытка восстановленного азота к этим клеткам также подавляло активность TnrA, как и в исходном штамме (рис. 1 В). При этом фактор TnrA в клетках обоих штаммов переходил из комплекса с GlnK в комплекс с GS (рис. 2). Следовательно, AmtB не принимает участия в передаче сигнала на фактор TnrA. Повышенную активность фактора TnrA в клетках, мутантных по белку AmtB, можно объяснить несколькими причинами. Во-первых, цитозольная локализация TnrA в AmtB-мутантах, вероятно, обеспечивает большую частоту взаимодействия TnrA с ДНК. Во-вторых, в мутантных штаммах происходят нарушения в транспорте ионов аммония (NH_4^+) в клетки.

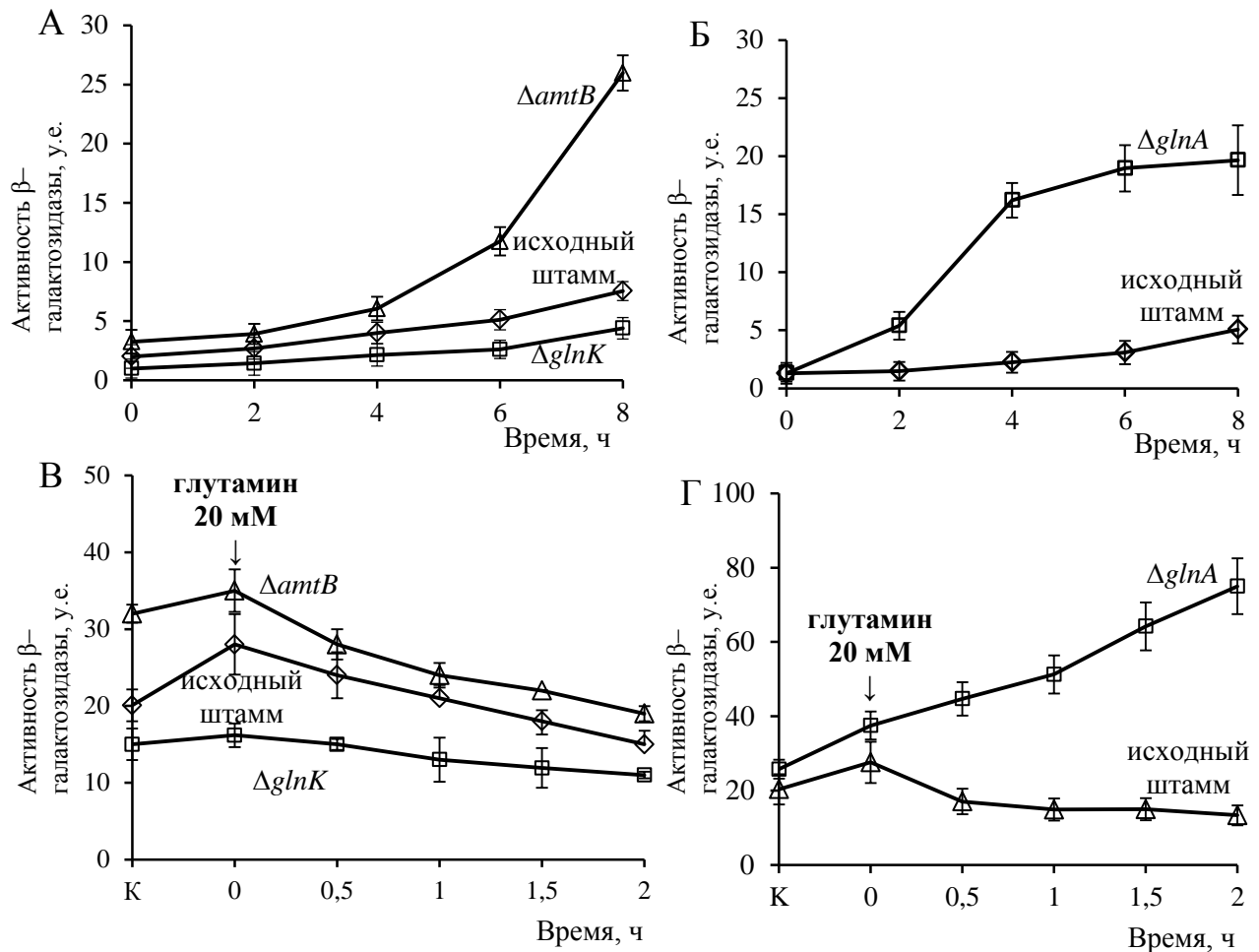


Рис. 1. Участие белков *AmtB*, *GlnK* и *GS* в контроле активности фактора транскрипции *TnrA* в условиях лимитирования по источнику азота (А - 20 мМ нитрат натрия; Б - 2 мМ глютамин) и после внесения глютамина до концентрации 20 мМ (В, Г). К – клетки, растущие в условиях лимитирования по источнику азота (2 мМ глютамин)

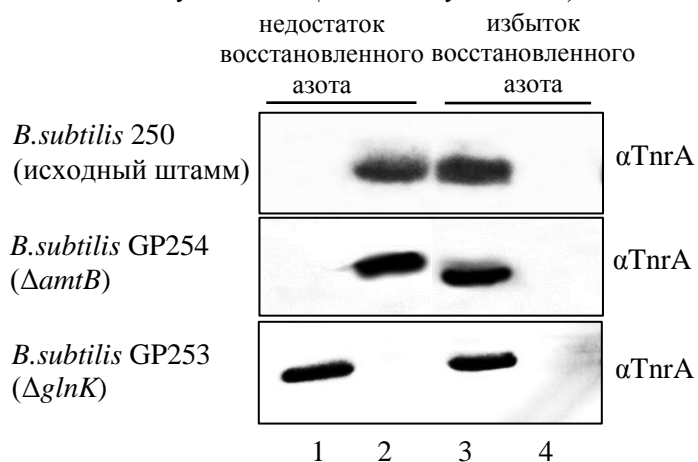


Рис. 2. Иммунопреципитация белков *GS* (1, 3) и *GlnK* (2, 4) в клетках *B. subtilis* 250, *B. subtilis* GP254 ($\Delta amtB$) и *B. subtilis* GP253 ($\Delta glnK$)

Ионы аммония частично диффундируют через клеточную мембрану из клетки в окружающую среду в виде свободного аммиака (NH_3) (Kleiner, 1985). Замер концентраций ионов NH_4^+ показал, что в культуральной жидкости исходного штамма, в котором белок *AmtB* возвращает аммоний снова в клетку (Detsch, Stulke, 2003), концентрация ионов NH_4^+ была почти в 1.5 раза ниже (53 ± 5.3 мкМ/ед. биомассы), чем в штамме с дефектом белка *AmtB* (73 ± 12.5 мкМ/ед. биомассы). Таким образом, в мутантном штамме происходят потери

восстановленного азота и образуется его дефицит в клетке, что, возможно, и ведет к повышению активности фактора TnrA (рис. 1). Концентрация NH_4^+ в культуральной жидкости штамма с дефектом белка GlnK оказалась в 1.8 раза выше, чем у исходного штамма (86 ± 18.4 мкМ/ед. биомассы). При отсутствии GlnK нарушается регуляция белка AmtB, что приводит к утечке NH_4^+ из клетки через открытый транспортный канал AmtB (Detsch, Stulke, 2003), и значит также наблюдается дефицит азота внутри клетки. Однако активность фактора TnrA в этом штамме была в 2 раза ниже по сравнению с исходным (рис. 1 А). Это можно объяснить конститутивным образованием комплекса TnrA-GS в этом штамме (Каюмов et al., 2011), что подавляет активность фактора TnrA независимо от доступности азота для клетки. В этом штамме фактор TnrA связан с GS как в условиях недостатка источника восстановленного азота, так и в условиях его избытка (рис. 2). Внесение глутамина к GlnK-дефектным клеткам, выращенным в условиях азотного голодания, не приводило к изменениям активности TnrA (рис. 1 В). Следовательно, GS в этом штамме подавляет активность фактора TnrA независимо от доступности азота. Вероятно, в клетках бацилл взаимодействие фактора TnrA с GlnK предотвращает его связывание с GS при недостатке азота и обеспечивает высокую активность фактора TnrA. Подтверждением этого вывода является тот факт, что в клетках, мутантных по гену *glnA*, активность β -галактозидазы в 7 раз выше, чем в клетках исходного штамма (рис. 1 Б). Это свидетельствует, что активность фактора TnrA в исходном штамме частично подавлена даже в условиях азотного голодания. В отсутствие GS репрессия TnrA снимается, что приводит к высокому уровню транскрипции TnrA-зависимых генов. Ранее было показано, что GS подавляет активность TnrA при избытке источника восстановленного азота (Wray et al., 2001). Наши данные впервые продемонстрировали, что и активная форма GS подавляет активность фактора TnrA даже в условиях лимитирования по азоту. Эти результаты также согласуются с данными о взаимодействии активной формы GS с TnrA в условиях *in vitro* (Каюмов et al., 2011).

Наблюдаемые различия в активности фактора TnrA в мутантных и исходном штаммах могут быть обусловлены как различиями регуляции его активности, так и изменением количества белка в клетке. Установлено, что количество TnrA во всех штаммах не отличается. Также не выявлено различий в содержании TnrA, GlnK и GS в исходном штамме после внесения избытка глутамина, что говорит о высокой стабильности этих белков внутри клеток. Следовательно, различия в активностях фактора TnrA в клетках обусловлены регуляцией его активности, а не изменением его количества.

Полученные данные подтверждают предположение о том, что активность фактора транскрипции TnrA определяется сменой его белка-партнера – GlnK

или GS. Сигналом для смены локализации может быть изменение аффинности этих белков к TnrA, вызванное ингибированием GS и снижением стабильности комплекса TnrA-GlnK. Ранее *in vitro* было показано, что АТФ подавляет взаимодействие TnrA с GlnK и GS, а глутамин и АМФ, наоборот, повышают способность GS связываться с TnrA (Kauymov et al., 2011). При повышении концентрации глутамина в среде повышается его концентрация в клетке, а также происходит изменение концентрации АТФ и АМФ (Forchhammer, 2006, 2008), что, по всей видимости, приводит в конечном итоге к изменениям аффинности GS и белка GlnK к TnrA. Вероятно, в клетке существует равновесие между концентрациями активной и неактивной форм TnrA (когда TnrA находится в комплексе с GlnK или с GS, соответственно), и смещение этого равновесия определяет активность фактора TnrA.

Исследования кинетических параметров взаимодействия GlnK и GS с TnrA в условиях *in vitro* подтверждают данное предположение. В присутствии только ионов Mg^{2+} 2 мМ или ионов Mg^{2+} 2 мМ и АТФ 2 мМ аффинность GlnK к TnrA практически в 2 раза превышает аффинность GS (табл. 1, рис. 3). Этим можно

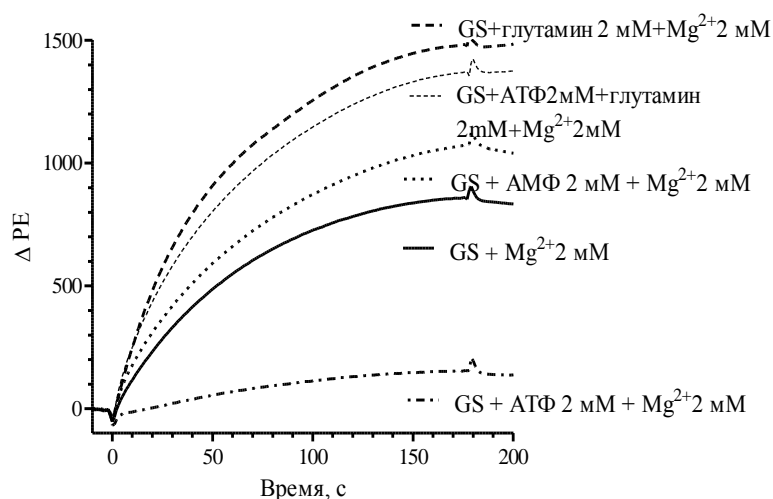


Рис. 3. ППР анализ влияния эффекторных молекул, АТФ, АМФ, глутамина и ионов Mg^{2+} на эффективность взаимодействия TnrA с GS. 1 PE (резонансная единица) эквивалентна одному пикограмму вещества на квадратном миллиметре сенсорной поверхности чипа

Табл. 1. Кинетические константы k_a и k_d и вычисленные равновесные константы диссоциации K_D для взаимодействия TnrA с GS и GlnK

| Белки | Константы скорости | | K_D , М |
|--|---|---------------------------------|----------------------------|
| | $k_a \times 10^5$, $M^{-1} \times c^{-1}$ | $k_d \times 10^{-4}$, c^{-1} | $k_d / k_a \times 10^{-9}$ |
| GS+ Mg^{2+} 2 мМ | 1.37 ± 0.03 | 7.6 ± 2.4 | 5.55 ± 2.8 |
| GS + АТФ 2 мМ + Mg^{2+} 2 мМ | 0.87 ± 0.03 | 19.4 ± 2.7 | 22.3 ± 2.3 |
| GS + АМФ 2 мМ + Mg^{2+} 2 мМ | 1.30 ± 0.09 | 7.2 ± 3.1 | 5.4 ± 2.8 |
| GS + глутамин 2 мМ + Mg^{2+} 2 мМ | 1.32 ± 0.18 | 5.08 ± 2.9 | 3.84 ± 2.2 |
| GS + глутамин 2 мМ + АТФ 2 мМ + Mg^{2+} 2 мМ | 1.45 ± 0.02 | 4.64 ± 0.8 | 3.21 ± 1.2 |
| GlnK+ Mg^{2+} 2 мМ | 6.44 ± 2.1 | 21.3 ± 1.4 | 3.31 ± 1.5 |
| GlnK + АТФ 2 мМ + Mg^{2+} 2 мМ | 2.89 ± 2.0 | 34.7 ± 1.23 | 12.1 ± 2.2 |
| GlnK + глутамин 2 мМ + АТФ 2 мМ + Mg^{2+} 2 мМ | 2.43 ± 0.9 | 31.8 ± 1.23 | 13.1 ± 1.4 |

объяснить коэлюцию фактора TnrA с белком GlnK в условиях азотного голодания, когда содержание глутамина в клетке минимально (рис. 2). При концентрации глутамина 2 мМ аффинность GS к TnrA превышает аффинность GlnK в 4 раза независимо от концентрации АТФ (табл. 1, рис. 3). Это, видимо, приводит к диссоциации комплекса TnrA-GlnK и связыванию TnrA с GS при избытке восстановленного азота, когда содержание глутамина в клетке повышается, и объясняет коэлюцию фактора TnrA с GS (рис. 2).

Таким образом, в зависимости от доступности восстановленного азота аффинность GS и белка GlnK к фактору TnrA в клетках меняется, и соотношение белков GlnK : GS ингибированная : GS активная определяет, с каким белком будет преимущественно взаимодействовать TnrA. В условиях азотного голодания, когда большая часть молекул GS находится в активном состоянии, фактор TnrA предпочтительнее взаимодействует с белком GlnK и проявляет свою максимальную ДНК-связывающую активность. В условиях избытка восстановленного азота (глутамина или ионов аммония) больше молекул TnrA связывается с ингибированной GS, что приводит к снижению активности этого фактора транскрипции.

2 Идентификация домена сигнальной трансдукции фактора транскрипции TnrA

Результаты проведенных экспериментов позволили сделать вывод, что активность фактора TnrA зависит от соотношения комплексов TnrA-GlnK и TnrA-GS. Однако влияние взаимодействия TnrA с GlnK и GS на ДНК-связывающую активность фактора транскрипции остается малоизученным.

Белки семейства MerR, к которым относится фактор транскрипции TnrA, активны в димерной форме и имеют два функциональных домена (Hobman, 2007): N-концевой домен взаимодействует с ДНК, С-концевой воспринимает регуляторный сигнал и контролирует ДНК-связывающую активность белка. Несмотря на высокую гомологию N-концевого домена с другими белками семейства MerR (Fisher, Wray, 2006, 2008), С-концевой домен TnrA значительно короче и имеет отличную структуру (Wray, Fisher, 2007). Известно, что GS связывается с С-концом TnrA и подавляет его активность, в активном состоянии TnrA связан с белком GlnK, однако молекулярные механизмы взаимодействия этих белков изучены недостаточно (Heinrich et al., 2006). Вероятно, С-концевой домен взаимодействует как с GS, так и с белком GlnK, и, по-видимому, участвует в сигнальной трансдукции (Wray, Fisher, 2007). Также остается неизвестным сайт димеризации фактора TnrA. Белки семейства MerR димеризуются по С-концевой α -спирали, однако удаление гомологичного домена фактора TnrA не нарушает его димеризацию (Wray, Fisher, 2007). Сравнительный анализ аминокислотной последовательности белков TnrA из

различных видов бацилл выявил аминокислоты, потенциально участвующие в димеризации (рис. 4, 5 А). Идентифицированные аминокислоты образуют несколько вероятных участков взаимодействия мономеров TnrA. Вероятно, олигомеризация белка TnrA происходит в его центральной части.

| | | |
|-----------------------------|--|-----|
| <i>B. subtilis</i> | DIANKREDGVQTAEILKDMRKKEQMLKNDPQVRKKMLEGQLNAHFYKNR | 110 |
| <i>B. vallismortis</i> | DIANKREDGVQTAEILKDMRKKEQMVKNDDPQVRKKMLEGQLNAHFYKNR | 110 |
| <i>B. atrophaeus</i> | DIANKREDGVQTAEILKDMRKKEQALKNDPQVRKKMLEGQLNAHFYKNR | 110 |
| <i>B. amyloliquefaciens</i> | DIANKREDGVQTAEILKDMRKKEQALKNDPQVRKKMLEGQLNAHFYKNR | 110 |
| <i>B. licheniformis</i> | DIANKREDGVQTAEILKDMRKKEQRLKNDQQLRKKMLEGQLNAHFYKNR | 110 |
| <i>B. aerophilus</i> | DIANKREDGVQTAEILKDMKKKEQALKSG-QYKKMLEGQINAHFYKNR | 109 |
| <i>B. pumilus</i> | DIANKREDGVQTAEILKDMKKKEQALKSG-QYKKMLEGQINAHFYKNR | 109 |
| <i>B. halodurans</i> | DIANKMEDGMQTFEI----RKMEQKQLRKKEVRDRMLRGQLNAAFNLRK- | 100 |
| <i>B. clausii</i> | DIANKMEDGMQTFEI----RKMEQKALRKQEVREMLRGQLNAAFNLRK- | 100 |
| <i>B. selenitireducens</i> | DIANKMEDGMQTFEI----RKQEMK---KSDVRDKMLRGQLNAAFKMRK- | 99 |
| <i>B. coagulans</i> | DIANKREEGIQTAEIRK--EYMKKKYNERTMREQVIRGQLNAYFRTRE- | 106 |
| <i>B. megaterium</i> | DIADRIEEGVQTSEIRTELAKKDEARKMK-EVKNQMLQGQLNAHFKRKL- | 108 |
| | :*: *: *: *: *: * | |

Рис. 4. Множественное выравнивание С-концевых доменов белков TnrA разных видов бацилл: * – полная идентичность; : – консервативные замены; . – полуконсервативные замены. Потенциальные аминокислоты, участвующие в димеризации белка TnrA выделены

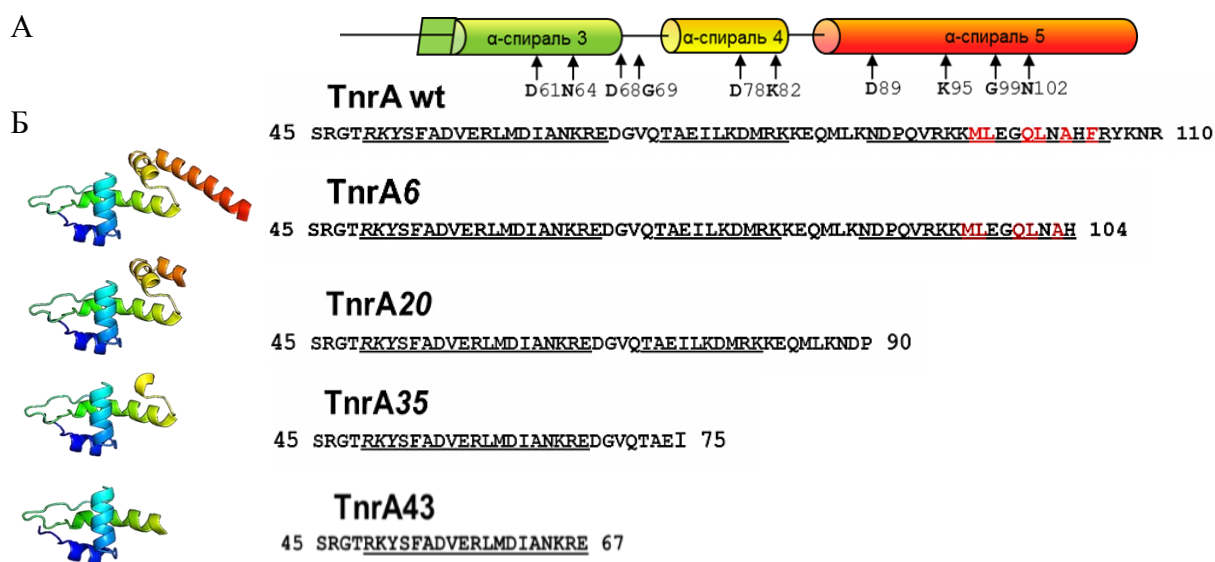


Рис. 5. Предполагаемая вторичная структура фактора транскрипции TnrA, (А) и делеции С-конца белка TnrA на 6, 20, 35 и 43 аминокислот (Б). Стрелками указаны аминокислоты, предположительно участвующие в димеризации белка. Красным обозначены аминокислоты, необходимые для взаимодействия с GS

На основе экспрессионного вектора pET15b были созданы плазмиды pET15-TnrA6, pET15-TnrA20, pET15-TnrA35 и pET15-TnrA43 для продукции рекомбинантных белков TnrA с делециями С-концевого домена на 6, 20, 35 и 43 аминокислоты (TnrA6, TnrA20, TnrA35, TnrA43) (рис. 5 Б). С помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA сефарозе были получены высокоочищенные фракции белков (рис. 6 А). Все рекомбинантные белки с делециями С-конца были способны к олигомеризации (рис. 6 Б). Следовательно, 8 из 10 предполагаемых аминокислот (D68, G69, D78, K82, D89, K95, G99, N102) не являются критическими для димеризации (рис. 4). Моделирование третичной структуры и возможной димеризации белка TnrA43

показало, что взаимодействие двух противоположно направленных α -спиралей (α -спираль-3, рис. 5 А), скорее всего происходит по остаткам аспарагиновой кислоты 61 и аспарагина 64.

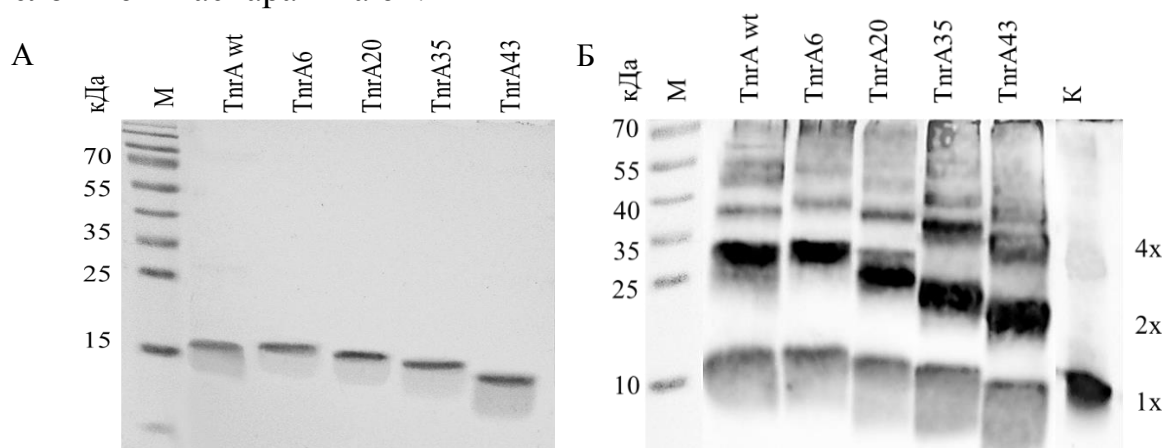


Рис. 6. Электрофорез очищенных белков *TnrA wt-His₆*, *TnrA6-His₆*, *TnrA20-His₆*, *TnrA35-His₆* и *TnrA43-His₆* в 15% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (А). Анализ димеризации мутантных белков *TnrA* методом поперечных сшивок (Б). К – белок *TnrA wt-His₆* в отсутствие глутарового агента. 1x, 2x, 4x – белки в моно-, ди- и тетрамерной формах

Для выяснения роли С-концевого домена фактора *TnrA* в контроле ДНК-связывающей активности N-конца, мы исследовали взаимодействие с ДНК мутантных белков *TnrA* методом ППР. Все белки связывались с ДНК (рис. 7), при этом аффинность белков к ДНК возрастала с увеличением делеции С-концевого домена, однако стабильность комплекса *TnrA*-ДНК снижалась (табл. 2).

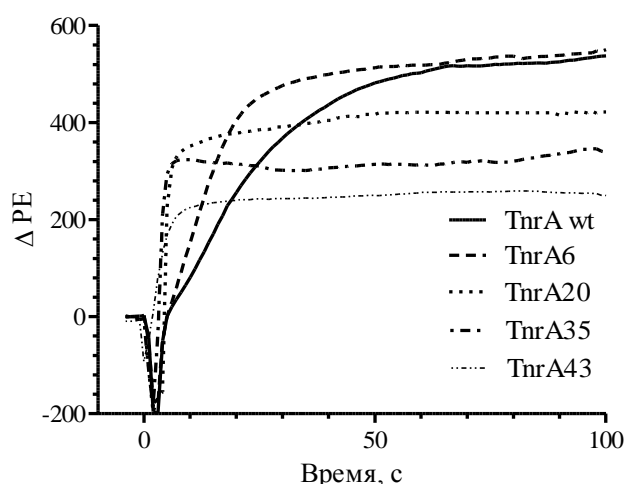


Рис. 7. ППР анализ взаимодействия белков *TnrA* с промотором *TnrA*-зависимого гена *nrgA*. Эффективность связывания белков с ДНК показана в резонансных единицах

Табл. 2. Кинетические константы k_a и k_d и вычисленные равновесные константы диссоциации K_D для взаимодействия *TnrA* с ДНК

| Белки | Константы скорости | | K_D , М |
|---------|---|------------------------------------|----------------------------|
| | $k_a \times 10^4$, $M^{-1} \times c^{-1}$ | $k_d \times 10^{-3}$, c^{-1} | $k_d / k_a \times 10^{-8}$ |
| TnrA wt | 2.8 ± 0.61 | 1.4 ± 0.06 | 5.0 ± 0.96 |
| TnrA6 | 4.2 ± 0.2 | 1.7 ± 0.06 | 4.1 ± 0.26 |
| TnrA20 | 8.1 ± 2.5 | 2.8 ± 0.01 | 3.5 ± 0.6 |
| TnrA35 | 13 ± 0.81 | 4.4 ± 0.01 | 3.4 ± 0.55 |
| TnrA43 | 15 ± 1.5 | 5.0 ± 0.01 | 3.4 ± 0.42 |

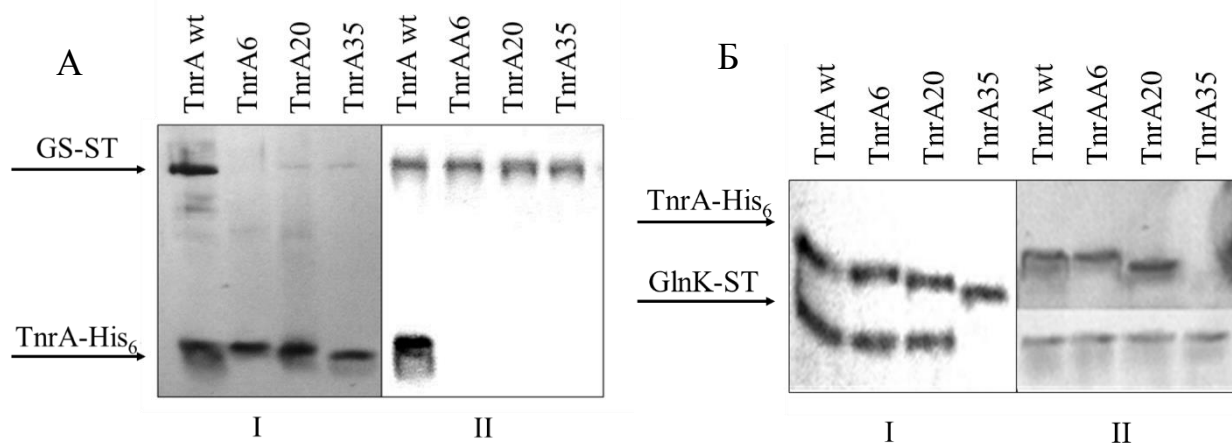


Рис. 8. Pull Down анализ взаимодействия нативного и мутантных белков TnrA с GS (А) и GlnK (Б). I – фракции элюции белковых комплексов, полученных на Ni-NTA сефарозе, II – фракции элюции белковых комплексов, полученных на стрептактин сефарозе

Таким образом, С-концевой домен контролирует ДНК-связывающую активность белка и необходим для стабилизации комплекса TnrA-ДНК.

Также нам удалось определить участки С-концевого домена, взаимодействующие с белками GlnK и GS (рис. 8). Так, 6 аминокислот с С-конца необходимы для связывания TnrA с GS. Вероятно, фенилаланин F105 выполняет ключевую роль в этом связывании (рис. 2). При этом для полного подавления TnrA-GlnK взаимодействия необходима делеция 35-ти аминокислот с С-конца. Следовательно, участок между аминокислотами L75 и P90 необходим для взаимодействия фактора TnrA с белком GlnK.

Таким образом, С-концевая область TnrA является доменом сигнальной трансдукции, необходима для взаимодействия с белками-регуляторами и контролирует ДНК-связывающую активность N-концевого домена (рис. 7 и 8). Ранее было показано, что делеция С-конца белка TnrA на 7 или 20 аминокислот приводит к конститутивной экспрессии TnrA-регулируемых генов, а удаление 34 аминокислот приводит к возникновению фенотипа, мутантного по этому белку (Shin et al., 2000). Следовательно, при удалении 7 или 20 аминокислот GS утрачивает способность подавлять активность фактора TnrA, который остается в комплексе с GlnK и обеспечивает конститутивную экспрессию генов TnrA - регулона. Очевидно, взаимодействие TnrA с GS и GlnK происходит по разным неперекрывающимся участкам. Скорее всего, TnrA способен одновременно взаимодействовать только с одним белком-партнером. Возможность конкурентного связывания TnrA с белком GlnK и GS мы исследовали методом ППР (рис. 9). С увеличением концентрации GlnK в смеси, эффективность связывания GS с TnrA заметно снижалась (рис. 9 А). Следовательно, GlnK способен препятствовать связыванию GS с TnrA (рис. 9 А). Однако, в присутствии ингибиторов GS – глутамина (20 мМ) и АМФ (10 мМ) (рис. 9 Б), GS в два раза эффективнее связывалась с TnrA, и наличие GlnK практически не

влияло на эффективность этого взаимодействия (рис. 9 Б). Эти данные свидетельствуют, что повышение аффинности ингибированной GS к фактору TnrA может определять переход TnrA из комплекса с GlnK в комплекс с GS при внесении избытка восстановленного азота к клеткам, растущим в условиях азотного голодания (табл. 1, рис. 2).

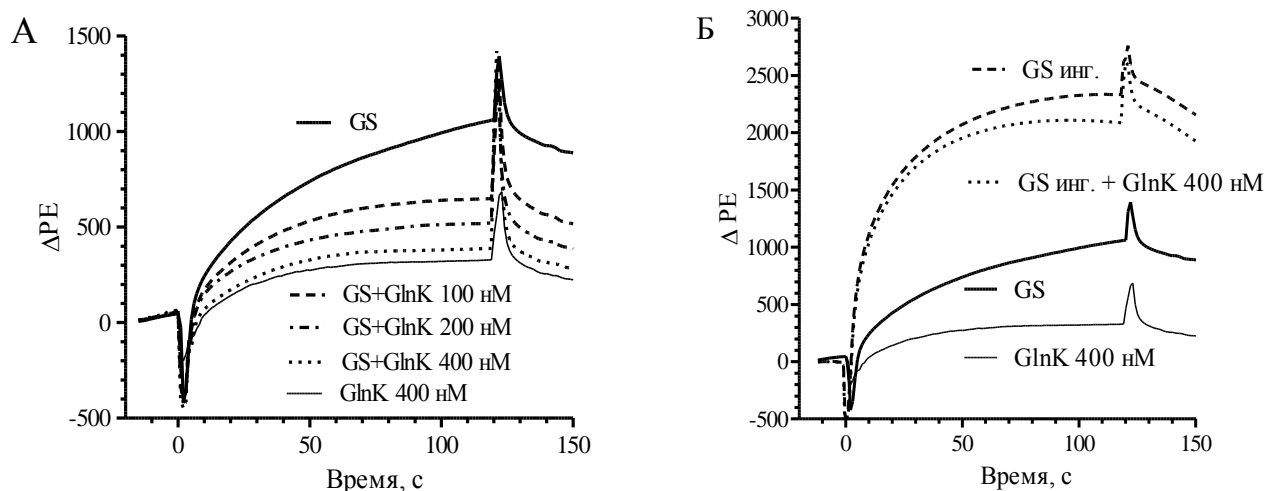


Рис. 9. ППР анализ влияния GlnK на формирование комплекса TnrA с активной GS (А) и ингибированной GS (Б). Концентрация GS во всех тестируемых пробах составляла 200 нМ

Ранее сообщалось, что связывание только с ингибированной GS снижает активность TnrA (Wray et al., 2001). ППР анализ показал, что присутствие ингибированной GS подавляет ДНК-связывающую активность TnrA в три раза (рис. 10 А, табл. 3). При этом и активная форма GS также снижала аффинность TnrA к ДНК почти в 1.5 раза (рис. 10 А, табл. 3). Возрастание K_D в присутствии как ингибированной, так и активной GS свидетельствует о дестабилизации комплекса TnrA-ДНК (табл. 3). Присутствие белка GlnK, напротив, увеличивает стабильность взаимодействия фактора TnrA с ДНК в 3 раза (табл. 3).

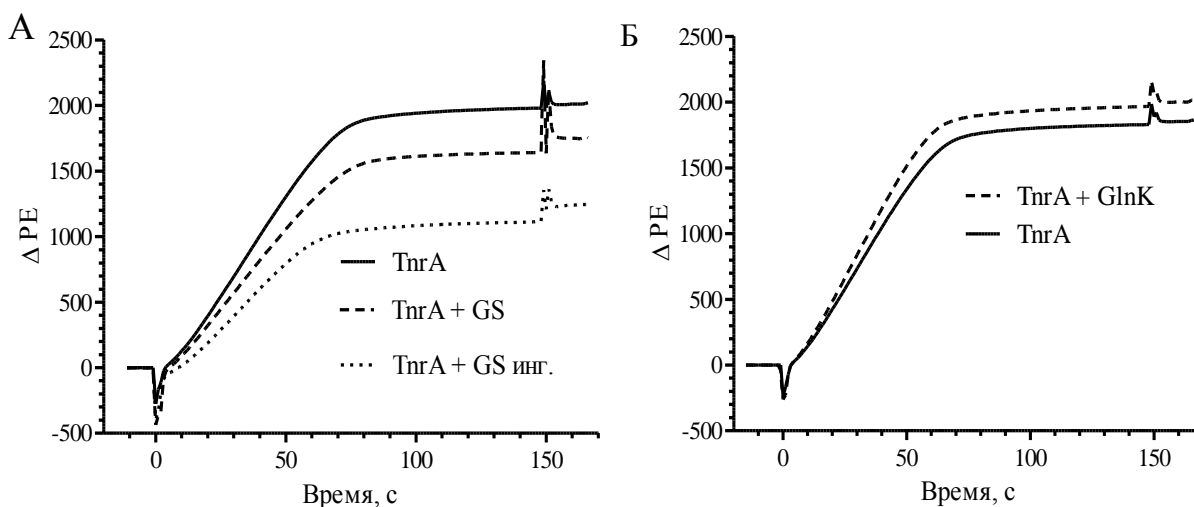


Рис. 10. ППР анализ влияния активной и ингибированной GS (А) и белка GlnK (Б) на ДНК-связывающую активность фактора транскрипции TnrA

Табл. 3. Кинетические константы k_a и k_d и вычисленные равновесные константы диссоциации K_D

| Белки | Константы скорости | | K_D , М |
|-------------------|---|-------------------------------------|----------------------------|
| | $k_a \times 10^4, \text{М}^{-1} \times \text{с}^{-1}$ | $k_d \times 10^{-3}, \text{с}^{-1}$ | $k_d / k_a \times 10^{-8}$ |
| TnrA wt | 6.7 ± 0.32 | 2.2 ± 0.17 | 3.2 ± 0.56 |
| TnrA wt + GS | 5.1 ± 0.23 | 3.7 ± 0.24 | 7.2 ± 0.45 |
| TnrA wt + GS инг. | 3.8 ± 0.52 | 4.4 ± 0.31 | 11.6 ± 0.62 |
| TnrA wt + GlnK | 7.2 ± 0.38 | 0.8 ± 0.24 | 1.1 ± 0.27 |

Полученные результаты согласуются с данными об активности фактора TnrA *in vivo*. При недостатке восстановленного азота в клетках, мутантных по белкам AmtB и GS, где TnrA связан с GlnK, активность TnrA выше, чем в клетках исходного штамма (рис. 1 А, Б). В отсутствие белка GlnK, TnrA конститутивно связан с активной GS и имеет активность ниже, чем в клетках дикого типа. Возможно, в условиях азотного голодания белок GlnK связывается с участком TnrA между L75 и P90 и блокирует участки взаимодействия с GS, предотвращая тем самым подавление активности TnrA со стороны крупной додекамерной молекулы GS. Напротив, избыток восстановленного азота приводит к подавлению активности GS и повышению ее аффинности к TnrA. GS связывает фактор TnrA и подавляет его ДНК-связывающую активность.

3 Участие фактора транскрипции TnrA в регуляции активности глутаминсинтетазы в клетках *Bacillus subtilis*

В отличие от других бактерий, в клетках *B. subtilis* активность GS контролируется путем подавления конечным продуктом, глутамином (Deuel, Prusiner, 1974). Уникальность GS бацилл заключается в том, что помимо ферментативной функции, GS контролирует экспрессию генов азотного обмена (Wray et al., 2001; Fisher et al., 2008). Этот фермент активирует фактор транскрипции GlnR и подавляет активность TnrA, образуя с ними белковые комплексы. Ранее было установлено, что TnrA связывается с GS вблизи глутамат-связывающего сайта (Fisher et al., 2002), что должно влиять на биосинтетическую активность GS. Чтобы проверить это предположение, исследовали влияние фактора TnrA на биосинтетическую активность GS в условиях *in vitro* и *in vivo*.

TnrA ингибировал ферментативную активность GS, и при соотношении одна молекула додекамера GS к 24 молекулам димерных TnrA остаточная активность фермента составляла 50%, тогда как мутантный белок TnrA6, не связывающий GS, не оказывал ингибирующего эффекта (рис. 11). Более того, полноценный белок TnrA усиливает эффект основных ингибиторов GS: АМФ и глутамин. В присутствии TnrA в пять раз меньше глутамин и в два раза меньше АМФ необходимо для подавления активности GS на 50% (рис. 11 Б, В).

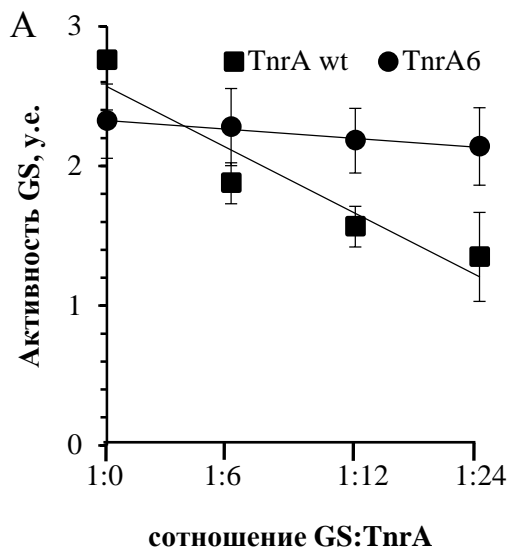
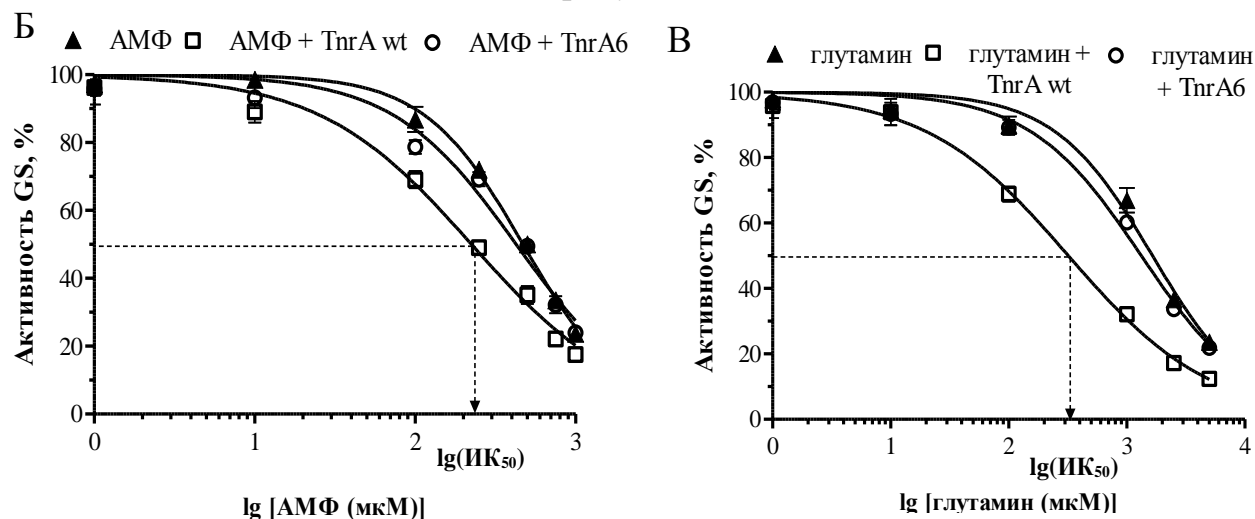


Рис. 11. Влияние белков TnrA wt (■) и TnrA6 (●) на активность GS (А). Влияние TnrA wt (□) и TnrA6 (○) на активность GS в присутствии АМФ (Б) и глутамина (В) при соотношении белков GS:TnrA-1:24. Концентрация АМФ, при которой наблюдается снижение активности GS на 50% (IK_{50}) $IK_{50}=470.3$ мкМ, в присутствии TnrA wt $IK_{50}=224.5$ мкМ, в присутствии TnrA6 $IK_{50}=426.4$ мкМ. Концентрация глутамина, при которой активность GS снижается на 50%: $IK_{50}=1651$ мкМ, в присутствии TnrA wt $IK_{50}=320.1$ мкМ, в присутствии TnrA6 $IK_{50}=1329$ мкМ



Также эффект подавления GS фактором TnrA наблюдали *in vivo* (рис. 12). В клетках, мутантных по GlnK, TnrA находится в комплексе с GS (Кауимов et al., 2011) (рис. 2). В условиях недостатка источника восстановленного азота активность GS в этом штамме была в два раз ниже, чем в клетках дикого типа (рис. 12, точка 0), несмотря на условия сильного дефицита азота, вызванные нарушением транспорта NH_4^+ . Следовательно, связывание TnrA с GS подавляет биосинтетическую активность фермента на 50%. Напротив, при отсутствии AmtB, когда TnrA находится в стабильном комплексе с GlnK, активность GS была выше, чем в клетках исходного штамма (рис. 12, точка 0). С другой стороны, причиной повышенной активности GS в этих клетках может быть нарушенный транспорт NH_4^+ .

В ответ на внесение глутамина активность GS в клетках, мутантных по GlnK, подавлялась всего на 20% в отличие от 60-70% ингибирования в клетках исходного типа. Данные о подавляющем эффекте белка TnrA, взаимодействующего с GS, на активность фермента, согласуются с данными иммунопреципитации (рис. 2).

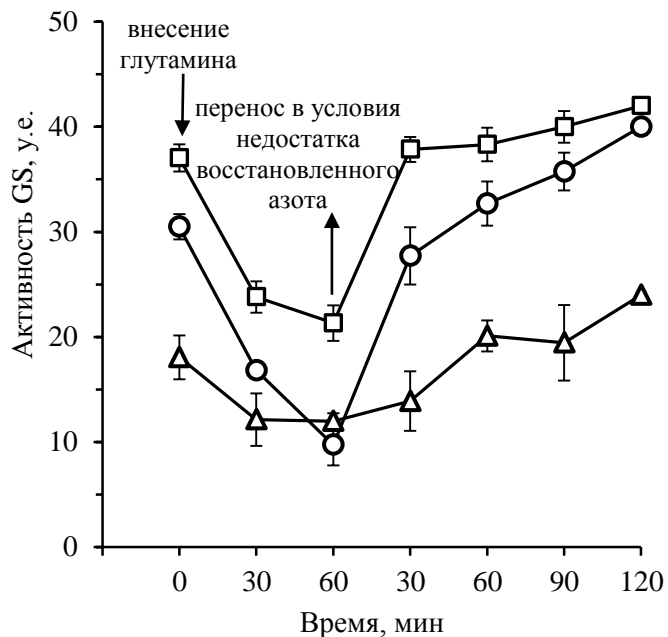


Рис. 12. Участие фактора транскрипции *TnrA* в регуляции биосинтетической активности GS в клетках *B. subtilis* 250 (○), *B. subtilis* GP253 (Δ) и *B. subtilis* GP254 (□). Клетки выращивали на среде SMM с нитратом в качестве источника азота. В поздней экспоненциальной фазе роста, к клеткам вносили глутамин до конечной концентрации 20 мМ. Через 60 мин культивирования клетки отмывали и переносили в среду с нитратом

В ответ на внесение глутамина активность GS в клетках, мутантных по *GlnK*, подавлялась всего на 20% в отличие от 60-70% ингибирования в клетках исходного типа, в которых *TnrA* связывался с GS (рис. 2). После переноса клеток обратно в условия азотного голодания, в клетках исходного штамма активность GS возрастала до начальных значений, что объясняется освобождением GS из комплекса GS-*TnrA*. В клетках, мутантных по белку *GlnK*, существенных изменений активности GS при смене доступности азота не происходило (рис. 12), вероятно, из-за конститутивного взаимодействия *TnrA* с GS (рис. 2).

Таким образом, репрессия активности GS фактором транскрипции *TnrA* представляет собой дополнительный способ регуляции ферментативной активности GS и служит механизмом быстрого ингибирования GS в ответ на резкую смену источника азота в среде. В условиях недостатка предпочтительного источника азота одной из возможных функций *GlnK-TnrA* взаимодействия является защита ферментативной активности GS от ингибирующего взаимодействия с фактором *TnrA*.

ВЫВОДЫ:

1. Установлено, что глутаминсинтетаза принимает участие в подавлении активности фактора транскрипции *TnrA* в условиях как избытка, так и недостатка источника восстановленного азота. Взаимодействие с белком *GlnK* обеспечивает высокую активность фактора *TnrA* и предотвращает связывание *TnrA* с глутаминсинтетазой. Транспортёр ионов аммония белок *AmtB* не участвует в передаче сигнала на фактор *TnrA*.
2. Переход фактора *TnrA* из мембраносвязанного состояния в цитоплазматическое определяется сменой аффинности к нему белка *GlnK* и

глутаминсинтетазы, и регулирует активность фактора TnrA в условиях недостатка и избытка источника восстановленного азота.

3. Белок GlnK не подавляет ДНК-связывающую активность фактора транскрипции TnrA, в то время как глутаминсинтетаза снижает способность фактора TnrA взаимодействовать с ДНК. При этом ингибированная глутаминсинтетаза снижает ДНК-связывающую активность фактора TnrA в два раза эффективнее, чем активный фермент.
4. На основе плазмиды pET15b созданы генетические конструкции для гиперпродукции рекомбинантных белков TnrA с укороченным С-концевым доменом на 6, 20, 35 и 43 аминокислоты, и соответствующие белки получены в электрофоретически гомогенном состоянии.
5. Близкорасположенные, неперекрывающиеся участки С-концевого домена фактора транскрипции TnrA отвечают за взаимодействие с белком GlnK и глутаминсинтетазой. С-концевой домен не участвует в димеризации, но контролирует ДНК-связывающую активность белка и необходим для стабилизации комплекса TnrA-ДНК.
6. Фактор транскрипции TnrA примерно в два раза подавляет биосинтетическую активность глутаминсинтетазы в условиях *in vitro* и в клетках *Bacillus subtilis*. В отсутствие белка GlnK фактор TnrA конститутивно связывается с глутаминсинтетазой и подавляет ее активность *in vivo*.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Fedorova K.**, Kayumov A., Woyda K., Plinskaja O., Forchhammer K. Transcription factor TnrA inhibits the biosynthetic activity of glutamine synthetase in *Bacillus subtilis* // FEBS Lett. – 2013. – V. 587. – P. 1293-1298. – (перечень ВАК), автора – 0.25 пл.
2. **Федорова К.П.**, Шарафутдинов И.С., Турбина Е.Ю., Богачев М.И., Ильинская О.Н., Каюмов А.Р. С-концевой домен фактора транскрипции TnrA из *Bacillus subtilis* контролирует активность ДНК-связывающего домена, но не участвует в димеризации белка // Молекулярная биология. – 2013. – Т. 47. – № 2. – С. 331-337. – (перечень ВАК), автора – 0.3 пл.
3. **Федорова К.П.**, Тарасов Н.В., Халитова А.В., Ильинская О.Н., Барабанщиков Б.И., Каюмов А.Р. Влияние белков AmtB, GlnK и глутаминсинтетазы на активность фактора транскрипции TnrA в клетках *Bacillus subtilis* // Цитология. – 2012. – Т. 54. – № 12. – С. 898-901. – (перечень ВАК), автора – 0.06 пл.
4. Каюмов А.Р., Халитова А.В., **Федорова К.П.**, Шмакова Л.А., Михайлова Е.О., Ильинская О.Н. Влияние глутаминсинтетазы на активность фактора транскрипции TnrA в клетках *Bacillus subtilis*// Вестник Казанского технологического университета. – 2012. – № 21. – С. 111–114. – (перечень ВАК), автора – 0.03 пл.

5. Kayumov A., Heinrich A., **Fedorova K.**, Ilinskaya O., Forchhammer K. Interaction of the general transcription factor TnrA with the PII-like protein GlnK and glutamine synthetase in *Bacillus subtilis* // FEBS Journal. – 2011. – V. 278. – P. 1779-1789. – (перечень ВАК), автора – 0.1 пл.
6. Каюмов А.Р., **Федорова К.П.**, Ильинская О.Н., Шарипова М.Р. Содержание и локализация регуляторных белков TnrA и GlnK в клетках *Bacillus subtilis* в условиях азотного голодания // Молекулярная биология. – 2010. – Т. 44. – № 4. – С. 743-745. – (перечень ВАК), автора – 0.06 пл.
7. Каюмов А.Р. Взаимодействие фактора транскрипции TnrA с белком GlnK и глутаминсинтетазой в клетках *Bacillus subtilis* / А.Р. Каюмов, **К.П. Федорова**, М.Р. Шарипова, К. Форшхаммер / Материалы докладов IV Российского симпозиума «Белки и пептиды». Казань: 2009. – С. 200.
8. **Федорова К.П.** Регуляторные белки TnrA, GlnK, GS *Bacillus subtilis* в условиях азотного голодания / Федорова К.П., Каюмов А.Р. // Материалы докладов XVI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов». Москва: 2009. – С. 14.
9. **Fedorova K.P.** The regulatory proteins TnrA, GlnK, GS in *Bacillus subtilis* under conditions of nitrogen starvation / Fedorova K.P., Kayumov A.R., Sharipova M.R., Forchhammer K. // The materials of the XIV international conference devoted to 20th anniversary of partnership between Kazan State University and Lustus-Liebig Giessen University. Kazan: 2009. – P. 24-25.
10. Kayumov A.R. Inactivation of the general transcription factor TnrA in *Bacillus subtilis* by proteolysis / Kayumov A.R., **Fedorova K.P.**, Sharipova M.R., K. Forchhammer // The materials of the XIV international conference devoted to 20th anniversary of partnership between Kazan State University and Lustus-Liebig Giessen University. Kazan: 2009. – P. 32-33.
11. **Fedorova K.P.** The response of regulatory proteins TnrA, GlnK, GS in *Bacillus subtilis* to nitrogen starvation / Fedorova K.P., Kayumov A.R., Sharipova M.R., Forchhammer K. // Abstracts of the 13th annual Symposium for Biology Students of Europe «SymBioSE 2009» «Biology: Expansion of Borders». Kazan: 2009. – P. 51.
12. Каюмов А.Р. Регуляция активности фактора транскрипции TnrA в клетках *Bacillus subtilis* путем протеолиза и взаимодействия с белками GlnK и GS / Каюмов А.Р., **Федорова К.П.** // Труды Томского Государственного Университета. Томск: 2010. – Т. 275. – С. 357-359.
13. **Федорова К.П.** Влияние С-концевого домена фактора транскрипции TnrA на его взаимодействие с белком BsGlnK / Федорова К.П., Каюмов А.Р. // Труды Томского Государственного Университета. Томск: 2010. – Т. 275. – С. 421-423.
14. **Федорова К.П.** Взаимодействие *in vitro* фактора транскрипции TnrA *Bacillus subtilis* с белком BsGlnK / Федорова К.П., Каюмов А.Р., Шарипова М.Р.

- // Материалы докладов 14-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых Биология наука XXI века. Пущино: 2010. – Т. 2 – С. 191-192.
15. **Федорова К.П.** Влияние С-концевого домена фактора транскрипции TnrA на его взаимодействие с белком BsGlnK / Федорова К.П., Каюмов А.Р. // Тезисы докладов российской школы молодых ученых «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии. Казань: 2010. – С. 62.
16. Каюмов А.Р. Взаимодействие фактора транскрипции TnrA с белками GlnK и GS в клетках *Bacillus subtilis* / Каюмов А.Р., **Федорова К.П.** // Тезисы докладов российской школы молодых ученых «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии. Казань: 2010. – С. 27.
17. **Федорова К.П.** Поведение белков TnrA, GlnK, GS в клетках *Bacillus subtilis* в условиях азотного голодания / Федорова К.П., Каюмов А.Р. // Материалы V всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой». Саратов: 2010. – С. 81.
18. **Федорова К.П.** Механизм защиты фактора TnrA от протеолиза путем взаимодействия с белком GlnK и глутаминсинтетазой / Федорова К.П., Каюмов А.Р., Ильинская О.Н. // Международная конференция молодых ученых «Молодежь в науке – 2011». Минск: 2011. – С. 180-183.
19. **Федорова К.П.** Взаимодействие фактора транскрипции TnrA в клетках *Bacillus subtilis* с белком GlnK и глутаминсинтетазой в условиях недостатка и избытка азота / Федорова К.П., Каюмов А.Р., Ильинская О.Н. // Естественные науки и современность: проблемы и перспективы исследований. Материалы VI Всероссийской научно-практической (заочной) конференции. НИИРРР, Москва: 2011. – С. 61-65.
20. **Федорова К.П.** Взаимодействие фактора транскрипции TnrA с регуляторным белком GlnK и Глутаминсинтетазой / Федорова К.П., Каюмов А.Р. // Материалы XVIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов». Москва: 2011. – С. 197-198.
21. **Федорова К.П.** С-концевой домен фактора транскрипции TnrA необходим для взаимодействия с глутаминсинтетазой и белком GlnK / Федорова К.П., Каюмов А.Р., Ильинская О.Н., Тарасов Н.В., Шарафутдинов И.С. // Материалы докладов 15-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых Биология наука XXI века. Пущино: 2011. – С. 63
22. **Федорова К.П.** Изменение активности фактора транскрипции TnrA при связывании с GS и белком GlnK / Федорова К.П., Тарасов Н.В., Каюмов А.Р. // Конференция «Физико-математические и естественные науки». Москва: 2011. – С. 39-41.
23. **Fedorova K.** The C-terminal region of transcription factor TnrA is required for interaction with glutamine synthetase and GlnK protein / Fedorova K., Tarasov N. // III Annual International Scientific conference in Biology. Tbilisi: 2011. – P. 65-66.

24. **Fedorova K.** The interaction of transcription factor TnrA with glutamine synthetase and PII-like protein GlnK / Fedorova K., Kayumov A., Forchhammer K. // Annual Conference of the VAAM. Tuebingen: 2012. – P. 204-205.
25. **Fedorova K.** The interaction between transcription factor TnrA, GlnK and glutamine synthetase in *Bacillus subtilis* / Fedorova K., Forchhammer K. // Materialien zum wissenschaftlichen Seminar der Stipendiaten der Programme «Michail Lomonosov II» und «Immanuel Kant II» 2011/2012. Moskau: 2012. – P. 34-37.
26. **Федорова К.П.** Взаимная регуляция активности глутаминсинтетазы и фактора транскрипции TnrA путем их взаимодействия в клетках *Bacillus subtilis* / Федорова К.П., Ильинская О.Н., Каюмов А.Р. // Материалы докладов II международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». Казань: 2012. – С. 165-166.
27. Тарасов Н.В. Влияние АТФ на процесс диссоциации TnrA из комплекса белков TnrA-GlnK в условиях отсутствия источников азота / Тарасов Н.В., **Федорова К.П.**, Каюмов А.Р. // Материалы докладов II международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине». Казань: 2012. – С. 91-92.
28. **Федорова К.П.** Глутаминсинтетаза – корегулятор активности фактора транскрипции TnrA в клетках *Bacillus subtilis* / Федорова К.П., Каюмов А.Р., Ильинская О.Н. // Материалы докладов Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология наука XXI века». Пущино: 2013 – С. 236-237.
29. Шарафутдинов И.С. С-концевой домен фактора транскрипции TnrA из *Bacillus subtilis* контролирует активность ДНК-связывающего домена, но не участвует в димеризации белка / Шарафутдинов И.С., **Федорова К.П.**, Каюмов А.Р. // Материалы докладов Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология наука XXI века». Пущино: 2013 – С. 242-243.
30. Тарасов Н.В. Влияние белков AmtB GlnK и глутаминсинтетазы на активность фактора транскрипции TnrA в клетках *Bacillus subtilis* / Тарасов Н.В., Халитова А.В., **Федорова К.П.**, Каюмов А.Р. // Материалы докладов Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология наука XXI века». Пущино: 2013 – С. 230-231.

E-mail автора: kpfedorova@gmail.com

Просьба высылать отзывы на автореферат по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, главное здание КФУ, отдел аттестации научно-педагогических кадров, ученому секретарю диссертационного совета Д 212.081.08 д.б.н., проф. Абрамовой З.И., факс: (843)238-76-01. E-mail: ziabramova@mail.ru